蝶と蛾 *Lepidoptera Science* **68**(2): 73–78, August 2017

交配実験による日本産コヒョウモン属 *Brenthis* の再検討

北原　曜[1)]・黒田　哲[2)]

[1)] 396-0014 長野県伊那市狐島 4224-1
[2)] 063-0847 札幌市西区八軒 7 条西 1-1-12

Revision of genus *Brenthis* (Lepidoptera, Nymphalidae) in Japan by mating experiments

Hikaru KITAHARA[1)] and Satoshi KURODA[2)]

[1)] Kitsunejima 4224-1, Ina, Nagano, 396-0014 Japan
[2)] 1-1-12 Hachiken-7-jyo, Nishiku, Sapporo, Hokkaido, 063-0847 Japan

Abstract Genus *Brenthis* in Japan has hitherto been divided into two species, each with two subspecies. Mating experiments using the cage pairing method were carried out to clarify the degree of reproductive isolation between each of the subspecies of both species. Cage pairing experiments with *B. ino* showed that the two subspecies easily copulate. The inter-subspecific F1 hybrids of the forward and reverse crosses developed to maturity, and normal adults emerged with a normal sex ratio. The backcrossing results showed that F1 individuals could reproduce. As there was no reproductive isolation between these subspecies, the two subspecies of *B. ino* in Japan should be regarded as a single taxon. In contrast, male and female individuals of the subspecies of *B. daphne* did not copulate. As complete mating isolation between two subspecies of *B. daphne* appears to exist, the two subspecies of *B. daphne* in Japan should be regarded as distinct species.

Key words *Brenthis daphne, Brenthis ino,* cage pairing, F1 hybrid, mating experiment.

はじめに

日本産コヒョウモン属（*Brenthis*）は，コヒョウモン *B. ino* Rottemburg とヒョウモンチョウ *B. daphne* Bergsträsser の 2 種で構成され，それぞれ 2 亜種が隔離して分布する．コヒョウモンは，北海道に ssp. *mashuensis* Kono，本州中部地方と関東地方北部周辺に ssp. *tigroides* Fruhstorfer の 2 亜種が，ヒョウモンチョウは，北海道と東北地方北部に ssp. *iwatensis* Okano，本州中部地方と関東地方北部周辺に ssp. *rabdia* Butler の 2 亜種が，それぞれ隔離分布する（白水ら，1976 など）．

日本産両種の各亜種については，幼虫の形態（Fig. 1）や成虫の斑紋（Fig. 2）が明瞭に異なるため，これまで染色体や DNA の違いが調べられている．染色体数については，Matsuoka *et al.*（1983），斎藤ら（1985，1989），斎藤（1986，1988），阿部・斎藤（2014）の一連の研究で，両種の染色体数（n）が，コヒョウモンは 2 亜種とも 14 で亜種間に差がないが，ヒョウモンチョウでは ssp. *iwatensis* が 12 であるのに対し，ssp. *rabdia* は 13 であり，亜種間で 1 本の常染色体数の増減が見られることを報告している．一方，DNA については，最近，濱本ら（2016）が日本産両種の各亜種を対象にミトコンドリア *COI* 遺伝子の一部と *ND5* 遺伝子の一部を解析した結果，コヒョウモンは亜種間で遺伝的に分化していないが，ヒョウモンチョウでは亜種間で塩基対が 1.2％異なり，遺伝的に大きく分化していることを報告している．

このように，コヒョウモンについては，両亜種間で幼生期
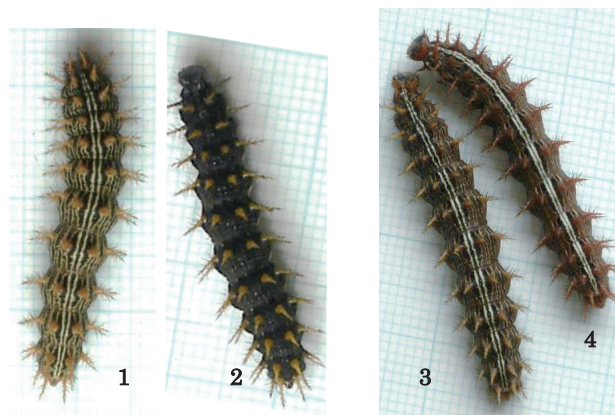
図 1. 日本産コヒョウモンとヒョウモンチョウの各 2 亜種の終齢末期幼虫．

Fig. 1. Mature larvae of each subspecies of *Brenthis ino* and *B. daphne* of Japan.
1: *B. i. mashuensis*; 2: *B. i. tigroides*; 3: *B. d. iwatensis*; 4: *B. d. rabdia.*

図 2.　交配実験に用いた両種各亜種の産地の♂表裏（左 2 行）と♀表裏（右 2 行）.

Fig. 2. Male (left two columns) and female (right two columns) adults of the locality of each subspecies used for the mating experiment.

1-4: *B. i. mashuensis* (Toyooka, Bihoro Town, Hokkaido) ; 5-8: *B. i. tigroides* (Kaida, Kiso Town, Nagano Pref.) ; 9-12: *B. d. iwatensis* (Toyooka, Bihoro Town, Hokkaido) ; 13-16: *B. d. rabdia* (Kaida, Kiso Town, Nagano Pref.).

を含めて形態が著しく異なるが染色体数と DNA は同じであり，ヒョウモンチョウについては両亜種間で形態だけでなく染色体数と DNA が異なることが知られている．しかし，両種の各亜種間で交配実験は行われたことがなく，染色体数や DNA の違いが生殖隔離のある別種を表しているのか未解明なままである．

そこで，両種各亜種の染色体数あるいは遺伝子の相違が交配に及ぼす影響を明らかにするため，ケージペアリング法により交配実験を行い，両種の各亜種間の関係を再検討することを目的とした．

材料および方法

両種の各亜種の産地については，白水ら（1976），福田ら（1983），白水（2006），猪又（2013）などに従い，以下の通りとした．交配実験では，全て累代した個体を用いた．

B. ino：ssp. *mashuensis*（美幌町豊岡）：以下，北コヒ
　　ssp. *tigroides*（木曽町開田）：以下，長コヒ

B. daphne：ssp. *iwatensis*（稚内市声問，美幌町豊岡，函館市神山）：以下，北ナミ
　　ssp. *rabdia*（木曽町開田）：以下，長ナミ

ケージペアリング実験には，北原（2015）と同じ，高さ 30cm，幅 22.5cm，奥行 30cm の木枠の直方体で 5 面に寒冷紗を張ったケージを使用し，ケージ内には 2～3 ♂と 1～2 ♀を入れた．実験は，2012～15 年に産地を変えて毎年 6 月に概ね午前 6 時から 9 時まで行った．実験は，交尾が確認されたらそのケージは終了とし，交尾が確認されなかった場合は 2 日間継続した．なお北ナミについては，複数の産地の個体を実験に使用したため，産地間の交配実験も
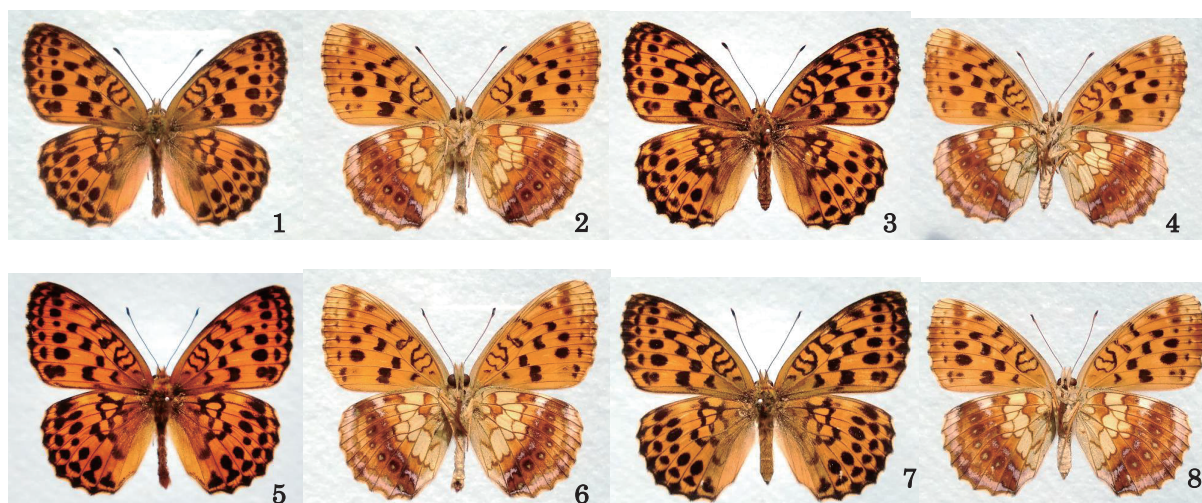
図 3.　コヒョウモン 2 亜種の亜種間雑種第 1 代 F1 の♂表裏（左 2 行）と♀表裏（右 2 行）.

Fig. 3. Male (left two columns) and female (right two columns) adults of F1 hybrid between both subspecies of *Brenthis ino*. 1-4: ssp. *mashuensis* ♀ × ssp. *tigroides* ♂ ; 5-8: ssp. *tigroides* ♀ × ssp. *mashuensis* ♂

行った.

ケージペアリング実験で交尾した組み合わせについては，亜種間雑種 F1 を飼育羽化させ，さらにいろいろな組み合わせの戻し交配（BC）を行い，メス親から多数採卵し，BC1 となる卵の孵化率を測定した.

結果および考察

1．ケージペアリング実験

ケージペアリング実験の結果を表に示す．各分数の分母は実験ケージ数，分子は交尾した組数である．まずコヒョウモンについては，同亜種間，別亜種間の全ての組み合わせで容易に交配した．すなわち，北コヒ♀と長コヒ♂の組み合わせでは実験回数 3 回中 3 組，長コヒ♀と北コヒ♂では実験回数 1 回中 1 組が交尾し，別亜種間の組み合わせでも 100％交尾した．別亜種間の配偶行動も同亜種間と全く同じで，♂の入ったケージ内に♀を入れると，1 時間以内に交尾した．したがって，狭い空間のケージペアリング実験ではあるが，両亜種間に交配前隔離はないと判断された.

一方，ヒョウモンチョウについては，両亜種間で正逆とも交尾しなかった．すなわち，同亜種同士の組み合わせである北ナミ同士が実験回数 10 回中 9 組，長ナミ同士が実験回数 4 回中 4 回でほぼ 100％交尾したのに対し，北ナミ♀と長ナミ♂の組み合わせでは実験回数 15 回中 0 組，その逆組み合わせの長ナミ♀と北ナミ♂では実験回数 11 回中 0 組で，別亜種間では全く交尾しなかった．別亜種間の配偶行動の観察では，♂♀双方とも相手に無関心で，♂♀が近接して静止したり，♂がホバリング飛翔や尾端を曲げたりする行動は全く認められなかった．なお，北ナミ同士のケージペアリング実験 10 回の中には，美幌町産♀と函館市産♂の組み合わせでの実験回数 2 回中 1 組，函館市産♀と美幌町産♂での実験回数 1 回中 1 組の交尾が含まれる．このうち前者の組み合わせで交尾に至らなかった 1 回の実験は，♂が虚弱であったためと考えられる．したがって，正常な♂であるならば同亜種間では産地が異なっても交尾が正常に行われると判断された.

以上，ヒョウモンチョウについては，北ナミと長ナミは正逆の組み合わせでの計 26 回のケージペアリング実験で交尾が認められず，強い交配前隔離が成立していると判断された.

次に，北海道の北コヒと北ナミの交雑性について検討する．北原（2008，2012）は，長ナミ♀と長コヒ♂の組み合わせではケージペアリングで時に交尾すること，F1 と BC1 は生殖能力があること，混棲地で自然雑種が少なからず発生していることなどを報告した．また，濱本ら（2016）では，北ナミの *mt*DNA は長ナミよりむしろコヒョウモンに近いことを報告している．これらのことから，北海道の北コヒと北ナミの混棲地でも自然雑種の可能性が考えられるが，北コヒと北ナミは成虫の判別が難しいことなどから具体的な報告はない．将来，DNA 情報に基づく判別法を確立する必要がある．表 1 に示したように，北ナミ♀と北コヒ♂の組み合わせで 6 回，北コヒ♀と北ナミ♂の組み合わせで 3 回のケージペアリング実験を行ったが，正逆とも全て交尾に至らず，また配偶行動も認められなかった．実験回数が多くはないが，北海道の北コヒと北ナミの混棲地では，本州中部の長ナミと長コヒの場合のような交雑は起こりにくい可能性がある.

2．コヒョウモンの亜種間雑種 F1 の成育

表 2 にコヒョウモンの亜種間雑種の飼育結果を示す．飼育は，北コヒ♀×長コヒ♂の 2 組，長コヒ♀×北コヒ♂の 1

組で行った．*Brenthis* 属の卵は，越夏越冬させるのが難しく，表に示したように一部の孵化率が低かったが，概ね各組み合せの孵化率，蛹化率は正常であった．また羽化成虫もほとんどが正常で，その性比もほぼ 1：1 で正常であった．F1 の戻し交配実験は以下のとおり行った．ただし，北コヒ♀×長コヒ♂の 2 組の F1 は正交配(1)F1 と正交配(2)F1，長コヒ♀×北コヒ♂の 1 組は逆交配 F1 とする．

正交配(1)F1 ♀×北コヒ♂が 1 組
正交配(1)F1 ♀×長コヒ♂が 1 組
北コヒ♀×正交配(1)F1 ♂が 2 組
長コヒ♀×正交配(1)F1 ♂が 1 組
正交配(2)F1 ♀×北コヒ♂が 1 組
正交配(2)F1 ♀×長コヒ♂が 1 組
北コヒ♀×正交配(2)F1 ♂が 3 組
逆交配 F1 ♀×北コヒ♂が 1 組
逆交配 F1 ♀×長コヒ♂が 1 組
北コヒ♀×逆交配 F1 ♂が 3 組

以上の全て組み合わせのケージペアリング実験で容易に交尾したので，表 3 のように全てのメス親から採卵できた．全てのメス親の卵は黄色から紫褐色に変色し，全てが受精卵であることが確認された．なお，この BC1 の卵は，両親種も含めて卵の越夏越冬に失敗したため飼育できなかった．これらの結果から，F1 は正逆交配の♂♀とも生殖能力があると判断された．すなわち，ケージペアリング結果と F1 の飼育結果から，コヒョウモンの 2 亜種は同種であることが確認できた．

3. 日本産 *Brenthis* 属の帰属

以上のケージペアリング実験と飼育実験および戻し交配実験の結果から，日本産 *Brenthis* のうち，コヒョウモンの 2 亜種は同種，ヒョウモンチョウの 2 亜種は別種であると判断された．この結果は，染色体数や *mt*DNA の測定結果と同調していた．

Brenthis 属はユーラシアに 3 種分布するとされ，このうちコヒョウモンとヒョウモンチョウはユーラシア大陸の北部に広く分布する（白水，1976 など）が，各地でいくつかのグループがあり両種とも多様に変異している（猪又，2013 など）．本報告で，ヒョウモンチョウの 2 亜種は別種であると判断されたが，このヒョウモンチョウ 2 種については，ヨーロッパ産の *B. daphne* との対応関係が未解明であるため，現時点ではどちらが *B. daphne* なのか帰属が確定できない．斎藤（1988）は，日本産とヨーロッパ産の *Brenthis* の染色体数を比較検討し，*B. daphne*（イタリア産），*B. ino*（フィンランド産）は共に染色体数（n）が 13 としている．この報告の染色体数だけで類推すると，中部・関東地方北部周辺に分布するヒョウモンチョウは *B. daphne* である可能性が高く，東北地方北部・北海道に分布するヒョウモンチョウは *B. daphne* とは異なる新たな別種である可能性がある．しかし，同時に *B. ino* の染色体数が日本産 2 亜種とヨーロッパ産で異なるため，日本産コヒョウモンが果たしてヨーロッパ産と同種なのかという疑念がもたれる．いずれにしても，この属の分類については DNA 解析を広範に行うとともに，交配実験を並行して行う必要があ

表 1．*Brenthis* 属両種各亜種のケージペアリング結果.
Table 1. Results of cage pairing experiment of genus *Brenthis.*

		Female			
		B. i. mashuensis	*B. i. tigroides*	*B. d. iwatensis*	*B. d. rabdia*
Male	*B. i. mashuensis*	6/6	1/1	0/6	—
	B. i. tigroides	3/3	1/1	0/3	0/1
	B. d. iwatensis	0/3	0/8	9/10	0/11
	B. d. rabdia	—	—	0/15	4/4

The denominator indicates the number of cage pairing set, and the numerator indicates the number of copulation events.
—: Not carried out.

表 2．コヒョウモンの亜種間雑種第 1 代 F1 の飼育結果.
Table 2. Breeding result of F1 hybrid between both subspecies of *B. ino.*

Combination	No. eggs laid	No. hatched eggs (% hatchability*)	No. incubation larva used for breeding	No. pupa (%pupation)	No. normal adults
mashuensis ♀× *tigroides* ♂	180	70（38.9%）	64	32（50.0）	18 ♂ 14 ♀
Ditto	168	149（88.7%）	73	71（97.3）	32 ♂ 36 ♀
tigroides ♀× *mashuensis* ♂	298	38（12.8%）	31	14（45.2）	6 ♂ 8 ♀

* % hatchability of ssp. *mashuensis* is 52.8%, ssp. *tigroides* 81.3%

表 3.　コヒョウモンの亜種間雑種 F1 の戻し交配実験による採卵数

Table 3. The number of eggs laid by the back cross experiment of F1 hybrid between subspecies of *B. ino*.

		Female	
		ssp. *mashuensis*	ssp. *tigroides*
Male F1	No.1 of ssp. *mashuensis* ♀ × ssp. *tigroides* ♂	141,160	120
	No.2 of ssp. *mashuensis* ♀ × ssp. *tigroides* ♂	119,106,105	—
	ssp. *tigroides* ♀ × ssp. *mashuensis* ♂	111,158,129	—
		Male	
		ssp. *mashuensis*	ssp. *tigroides*
Female F1	No.1 of ssp. *mashuensis* ♀ × ssp. *tigroides* ♂	154	162
	No.2 of ssp. *mashuensis* ♀ × ssp. *tigroides* ♂	125	169
	ssp. *tigroides* ♀ × ssp. *mashuensis* ♂	120	112

ろう．なお，本報告で分離された日本産ヒョウモンチョウ 2 種の和名については，東北北部・北海道産をキタヒョウモン，中部・関東北部周辺産をコウゲンヒョウモンと呼称したい．

おわりに

交配実験と飼育実験から，日本産 *Brenthis* 属のうちコヒョウモンの 2 亜種は同種であるが，ヒョウモンチョウの 2 亜種は別種であると判断された．

末尾ながら，信州大学名誉教授の伊藤建夫博士には，*Brenthis* 属の DNA 解析結果について様々なご教示を賜った．深く感謝申し上げる．

引用文献

阿部　東・斎藤和夫，2014．ヒョウモンチョウの染色体研究．*Butterflies*（*fujisanus*）**66**：66-68.

福田晴夫・浜　栄一・葛谷　健・高橋　昭・高橋真弓・田中　蕃・田中　洋・若林守男・渡辺康之，1983．原色日本蝶類生態図鑑Ⅱ．325pp，保育社，大阪．

濱本健汰・上田昇平・市野隆雄・中谷貴壽・宇佐美真一・伊藤建夫，2016．日本のヒョウモンチョウとコヒョウモンの関係―DNA 分子系統解析から判ったこと―．*Butterfly Science* **5**：17-24.

猪又敏男，2013．大型ヒョウモン（1）．月刊むし（**506**）：9-12.

北原　曜，2008．ヒョウモンチョウとコヒョウモンの種間関係．蝶と蛾 **59**：144-148.

北原　曜，2012．ヒョウモンチョウとコヒョウモンの人工雑種と混棲地における自然雑種．蝶と蛾 **63**：142-150.

Matsuoka, N., Y. Chiba, and K. Saito, 1983. Allozymic similarity in two species of the genus *Brenthis*（Lepidoptera:Nymphalidae）. *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**（3）：385-387.

斎藤和夫，1986. 北海道浜小清水産ヒョウモンチョウ（*Brenthis daphne iwatensis*）の染色体数．蝶と蛾 **37**：101-102.

斎藤和夫，1988．蝶類の染色体―1966 年前後から 1984 年までの形態学的研究から― . 蝶類学の最近の進歩．*Spec. Bull. Lep. Soc. Jap.*,（6）：499-525.

斎藤和夫・阿部　東・熊谷義則，1985．日本のコヒョウモン属（*Brenthis*）の染色体Ⅰ．北海道産ヒョウモンチョウ（*Brenthis daphne iwatensis*）の染色体再検討．蝶と蛾 **36**：83-86.

斎藤和夫・阿部　東・熊谷義則・小野　泱，1989．日本のコヒョウモン属（*Brenthis*）の染色体Ⅱ．北海道産コヒョウモン *Brenthis ino mashuensis*（KONO, 1931）雄の染色体調査．蝶と蛾 **40**：253-257.

白水　隆・川副昭人・若林守男，1976．原色日本蝶類図鑑（全改訂新版）．422pp，保育社，大阪．

白水　隆，2006．日本産蝶類標準図鑑．336pp，学習研究社，東京．

Summary

The genus *Brenthis* in Japan has traditionally been divided into two species. The lesser marbled fritillary, *B. ino* ssp. *mashuensis,* is distributed throughout Hokkaido, and another subspecies, *B. ino* ssp. *tigroides*, is distributed around the Chubu and North Kanto districts of Honshu. There is no overlap between the geographical distributions of these two subspecies. *B. ino* has remarkable morphological variety between the two subspecies（Fig.2）, including during the larval period（Fig.1）, but *mt*DNA sequences and chromosome numbers of them are not distinct. The marbled fritillary, *Brenthis daphne* ssp. *iwatensis,* is distributed over Hokkaido and the North Tohoku district, and another subspecies, *B. daphne* ssp. *rabdia,* is distributed around Chubu and the North Kanto district. There is no overlap between the geographical distributions of these two subspecies. In contrast to subspecies of *B. ino,* the two subspecies of *B. daphne* have different chromosome numbers and different sequences in *mt*DNA as well as differences in morphology at each stage（Figs 1, 2）. Therefore, mating experiments using the cage pairing

method will be helpful to clarify the existence of precopulatory isolation between them.

For the cage pairing experiments, 2 to 3 ♂ and 1 to 2 ♀ were placed in a screen cage（height, 30 cm; width, 22.5 cm; and depth, 30 cm）. Observations were made daily（6:00 AM to 9:00AM）in June from 2012 through 2015. Observations of all cages were continued for two days until copulation was confirmed. Mating experiments with *B. d. iwatensis* from multiple localities were also carried out. Inter-subspecific hybrids F1 from cage pairing combinations were bred to adults and backcrossed in various combinations.

Cage pairing experiments with *B. ino* showed that the two subspecies easily copulate（Table 1）. Mating behavior was identical between different subspecies and between members of the same subspecies. A male copulated with a female within 1 hour when two females were put in the cage with some males. Larvae of the inter-subspecific F1 hybrids of the forward and reverse crosses developed to maturity well, and normal adults emerged with a normal sex ratio（Fig. 3, Table 2）. The backcrossing results showed that F1 individuals could reproduce（Table 3）. Based on the successful mating between both subspecies, it is suggested that there is no reproductive isolation between these populations and that the two subspecies of *B. ino* are rightly placed as belonging to the same species.

In contrast, male and female individuals of the subspecies of *B. daphne* did not copulate with the offspring of forward and reverse crosses（Table 1）. For individuals from the same subspecies, 13 sets out of 14 copulated in the experiments. However, the combination of *B. daphne* ssp. *iwatensis* females and *B. daphne* ssp. *rabdia* males did not copulate at all in 15 pairing experiments, nor did the reverse combination of *B. daphne* ssp. *rabdia* females and *B. daphne* ssp. *iwatensis* males in 11 pairing experiments. Thus, the sex of each member in the subspecies pairings did not affect the outcome, and mating isolation between these subspecies was evident. Therefore, we concluded that the two subspecies of *B. daphne* in Japan should be regarded as different species. This raises the question as to which, if either, of the two Japanese taxa, *iwatensis* and *rabdia*, is conspecific with the nominate subspecies of *B. daphne.* This will require further molecular work, and for this reason no formal proposal for taxonomic change is made at this stage.

（Received December 15, 2016. Accepted March 18, 2017）